

M. Van Tieghem fait à la Société la communication suivante :

SUR LE *BACILLUS AMYLOBACTER* ET SON RÔLE DANS LA PUTRÉFACTION DES TISSUS VÉGÉTAUX, par **M. Ph. VAN TIEGHEM**.

On sait qu'un fragment d'organe végétal quelconque, exposé sous l'eau à une température convenable, macère d'abord, puis se putréfie. La macération, c'est l'ensemble des altérations produites dans les cellules par l'action dissolvante de l'eau et par le manque d'air; la structure cellulaire y est conservée. La putréfaction, c'est la dissociation et la destruction totale des cellules du tissu, avec résorption des membranes de cellulose qui en composent la trame. En même temps le liquide se trouble par le développement de divers organismes inférieurs, animaux ou végétaux, que l'on rencontre aussi en abondance dans la masse du tissu, soit entre les cellules, soit dans leurs cavités. Parmi ces organismes, la plupart se nourrissent simplement des principes solubles du protoplasma diffusés dans le liquide ou encore contenus dans les cellules, sont, en un mot, des organismes de macération; mais il en est un, de nature végétale, dont le développement est intimement lié à la destruction même des cellules et à la résorption de leurs membranes de cellulose, qui est essentiellement un organisme de putréfaction. La présence constante de cet organisme toutes les fois qu'il y a putréfaction, son absence toutes les fois qu'il n'y a que macération, et surtout le résultat des expériences d'inoculation dont il sera rendu compte plus loin, tout atteste que son développement et sa nutrition sont la cause nécessaire et suffisante de la destruction du tissu cellulaire, qu'il est l'agent propre de la putréfaction végétale, et qu'ainsi son rôle est des plus considérables dans l'économie de la nature. C'est de cet organisme remarquable, dont l'étude m'occupe depuis plusieurs années, que je demande à la Société la permission de l'entretenir quelques instants.

Pour se le procurer, il suffit de mettre sous l'eau et d'exposer à une température de 25 à 35 degrés des fragments d'organes végétaux quelconques : racine, tige, feuille, fleur, fruit ou graine, réceptacle sporifère de grands Champignons, etc., et de faire après quelques jours l'étude anatomique des tissus. On vérifiera donc facilement les caractères morphologiques qu'il présente aux diverses époques de son développement, et l'on répétera aisément les expériences auxquelles nous aurons recours pour mettre en évidence son rôle physiologique.

Caractères morphologiques aux divers états du développement. — Cet organisme se rattache au genre *Bacillus* de M. Cohn, mais avec des caractères particuliers qui en font une espèce distincte. C'est ce qu'il faut établir tout d'abord.

Des observations de MM. Pasteur et Cohn et des miennes propres sur le *Bacillus subtilis* (*Vibrio subtilis* d'Ehrenberg, Vibrion (ferment) butyrique

de M. Pasteur), jointes aux recherches récentes de M. Koch sur le *Bacillus anthracis* (Bactéridie de M. Davaine, cause présumée de la maladie dite du charbon ou du sang de rate), il résulte que le développement d'un *Bacillus* comprend quatre périodes successives. Dans la première, le corps cylindrique et grêle, récemment issu d'une spore, s'allonge rapidement et se cloisonne, les articles se séparant bientôt (*B. subtilis*) ou demeurant unis en longs filaments (*B. anthracis*) : c'est la phase d'accroissement et de multiplication, deux choses qui, au fond, n'en sont qu'une. Dans la seconde, les articles précédemment formés, ayant cessé de s'allonger et de se cloisonner, grossissent sensiblement en devenant le siège de transformations chimiques intérieures, et ce grossissement s'opère, suivant les cas, de trois manières différentes, avec des formes intermédiaires : tantôt il a lieu uniformément dans toute la longueur de l'article, qui demeure cylindrique ; tantôt il se localise, soit à l'une des extrémités de l'article qui se renfle en têtard, soit au milieu de l'article qui se renfle en fuseau : c'est la phase de grossissement, ou de nutrition solitaire et simultanée, qui prépare l'état suivant. Dans la troisième période ou phase reproductrice, il se forme, dans chaque article ainsi nourri, une spore sphérique ou ovoïde, homogène, très-réfringente, à contour sombre ; en même temps le protoplasma qui occupe le reste de la cavité se résorbe peu à peu et y est remplacé par un liquide hyalin qui sépare la spore de la membrane ; celle-ci se dissout à son tour, et finalement la spore est mise en liberté. Si l'article est renflé en têtard, c'est dans le renflement terminal que la spore prend naissance ; s'il est en fuseau, c'est vers son milieu ; s'il est cylindrique, ce peut être en un point quelconque, mais le plus souvent c'est vers une extrémité. La spore, mise en liberté, germe dans des circonstances favorables ; en un point où son contour pâlit, elle pousse un petit tube un peu plus mince qu'elle-même, qui s'allonge rapidement et se cloisonne. Cette quatrième période du développement, ou phase germinative, nous ramène ainsi à notre point de départ.

L'organisme que nous étudions aujourd'hui offre précisément la même forme et il passe par les mêmes phases de développement : accroissement et cloisonnement avec prompté séparation des articles comme dans le *B. subtilis*, d'où résulte une multiplication rapide ; grossissement des articles ainsi produits, sous les trois formes de cylindre, de têtard et de fuseau avec des états intermédiaires ; reproduction par une spore endogène mise en liberté par la résorption de la membrane de l'article ; enfin germination de cette spore en un bâtonnet, bientôt accru, cloisonné et disjoint. C'est donc un *Bacillus*, et par la dimension des articles, le mouvement qui les anime souvent, et leur prompté disjonction c'est au *B. subtilis* qu'il ressemble plus qu'à toute autre espèce.

Il en diffère par un caractère remarquable, dont l'apparition marque la fin de la période de multiplication et le début de la phase de grossisse-

ment, qui se développe et persiste dans toute cette phase et se prolonge même assez avant dans la période de reproduction. Ce caractère spécifique consiste en une formation transitoire d'amidon amorphe dans le protoplasma de l'article, qui à cette époque se colore en bleu ou en violet par l'iode. Avec un peu d'habitude on reconnaît d'ailleurs directement la présence de l'amidon dans le protoplasma, à la réfringence plus grande et toute spéciale qu'il lui communique. Dans l'article encore cylindrique, mais ayant cessé de s'allonger et de se cloisonner, l'amidon apparaît par points isolés formant autant de petits disques transversaux et le plus souvent dans l'ordre suivant : deux points aux extrémités, puis un au milieu, puis deux au milieu des intervalles et ainsi de suite ; enfin tous ces disques confluent et l'article bleuit dans toute sa longueur. Un peu plus tard, l'amidon disparaît de l'une des extrémités, qui demeure blanche après l'action de l'iode, et cette partie blanche peut quelquefois atteindre la moitié de la longueur de l'article ; quand il est renflé en têtard, c'est dans la tête que l'amidon disparaît. Cette résorption de l'amidon précède et annonce la formation de la spore dans cette même région. A mesure que celle-ci se forme, le protoplasma qui occupe le reste de l'article se dissout peu à peu et avec lui l'amidon qui l'imprègne. De sorte que pendant la dernière partie de la période reproductrice, l'article, formé alors d'une mince membrane remplie d'un liquide hyalin et contenant une spore, ne bleuit plus par l'iode, bien que pouvant conserver encore à cette époque la faculté de se mouvoir.

A l'état de spore libre, pendant la germination, pendant toute la période d'allongement, de cloisonnement et de multiplication, enfin pendant la dernière partie de la phase reproductrice, ce *Bacillus* ne se distingue donc que difficilement du *B. subtilis* ; son principal caractère spécifique, essentiellement transitoire, est la présence d'amidon amorphe, formé et mis en réserve pendant la période de grossissement pour être réemployé plus tard et consommé pendant la phase reproductrice (1).

M. Trécul a découvert cet organisme en 1865, dans les laticifères et les cellules parenchymateuses de diverses plantes lactescentes, soumises à la putréfaction dans le but d'isoler les laticifères (2) ; il en a fait, sous le nom d'*Amylobacter*, un genre distinct comprenant même trois sous-genres : *Urocephalum* pour les formes en têtard, *Amylobacter* vrai pour les formes cylindracées, *Clostridium* pour les formes en fuseau. Je conserverai ce mot comme appellation spécifique, et je désignerai désormais cet organisme sous le nom de *Bacillus Amylobacter*. Mais M. Trécul n'a

(1) Quand il s'accroît et se multiplie dans un espace étroit, ce *Bacillus* amylofère est immobile et ses articles sécrètent alors assez souvent une matière gélatineuse qui les agglutine en une masse compacte, caractère qui se retrouve d'ailleurs, on le sait, dans les autres plantes de la même famille.

(2) *Comptes rendus*, t. LXI, p. 156 et p. 436.

vu alors ces êtres qu'à l'état adulte pour ainsi dire, dans cette période moyenne de leur développement où, après avoir cessé de s'allonger et de se diviser, et souvent aussi de se mouvoir, ils ont acquis déjà de l'amidon sans l'avoir encore perdu : leur jeunesse, où ils se multiplient sans posséder encore d'amidon ; leur vieillesse, où ils se reproduisent après l'avoir perdu, leurs mouvements mêmes lui ont échappé. C'est ce qui explique qu'il ait cru les voir apparaître tous à la fois, immobiles sur place et spontanément dans les cellules par une transformation directe du protoplasma, apportant ainsi en faveur de la génération spontanée de ces organismes un argument auquel, que je sache, il n'a pas été jusqu'ici répondu. Le fait est qu'introduits et multipliés dans les cellules à l'état de *Bacillus* ordinaires, ils y deviennent, tous à la fois et par une nutrition indépendante, *Amylobacter* ; de façon que si on ne les recherche que par les réactifs iodés, ils peuvent paraître nés sur place tous ensemble et spontanément.

Peu de temps après, M. Nylander (1) faisait voir que les *Amylobacter* sont parfois doués de mouvement et souvent attachés plusieurs ensemble bout à bout, preuve de leur multiplication par scissiparité ; que par conséquent, sous ces deux rapports, ils se comportent comme les Bactéries. Les trois formes distinguées génériquement par M. Trécul sont d'ailleurs tenues par M. Nylander comme de simples variations d'un seul et même type.

Répondant deux ans plus tard à M. Nylander, M. Trécul a dû admettre l'existence du mouvement (au moins chez les *Amylobacter* vrais et les *Urocephalum*) et de la multiplication par division (au moins chez les *Amylobacter* vrais), signalés par ce botaniste ; en outre il a fait connaître l'état gélatineux sous lequel ces organismes se présentent quelquefois. Mais en même temps il a formellement maintenu l'autonomie de ses trois genres (*Urocephalum*, *Amylobacter* et *Clostridium*), et persisté à décrire le mode de formation de ces êtres comme simultané et spontané (2).

Depuis lors, les choses en sont restées là. On voit donc que si le *Bacillus Amylobacter* n'est pas nouveau pour la science, le développement de cet organisme, avec les conséquences que ce développement entraîne au point de vue de la place qui lui revient dans la classification naturelle et de sa prétendue génération spontanée, est exposé ici pour la première fois.

Rôle physiologique. — Presque au début de ces recherches, il s'est offert à moi par hasard et dans des circonstances toutes spéciales, une observation très-instructive, qui m'a placé d'emblée et forcément sur un terrain bien différent de celui où est resté M. Trécul. Dans une culture cellulaire de Coprin envahie par les Bactéries, j'avais aperçu, attachés

(1) *Bulletin de la Soc. bot.* 1865, t. XII, p. 395.

(2) *Comptes rendus*, 1867, t. LXV, p. 513.

par un bout au sommet encore intact d'une branche mycélienne, deux ou trois bâtonnets grêles qui se mouvaient en pirouettant autour de leur extrémité fixe. Quelques heures après, deux bâtonnets semblables, mais déjà allongés, se mouvaient à l'intérieur du tube, sans qu'il y eût de perforation visible dans sa membrane; le lendemain, la cellule en contenait un grand nombre, tous immobiles. Croyant avoir affaire au *Bacillus subtilis*, je notai sa pénétration et sa multiplication rapide à l'intérieur d'une cellule en apparence parfaitement close, comme un fait intéressant. Quelques heures plus tard, les bâtonnets avaient tous changé d'aspect; devenus fusiformes, ils avaient pris une réfringence spéciale qui, commençant à m'être connue, me suggéra l'idée d'ajouter à la culture une goutte de solution iodée; tous les articles bleuirent aussitôt, sauf à une extrémité: c'étaient des *Amylobacter*.

Éclairé ainsi sur l'origine et la nature de ces êtres, je pus donner une plus sûre direction à mes recherches physiologiques, dont je dois me borner ici à indiquer sommairement quelques-uns des résultats principaux.

1° Toutes les fois qu'il y a putréfaction du tissu végétal plongé, c'est-à-dire, d'après la définition donnée plus haut, destruction des membranes de cellulose qui en composent la trame, on trouve le *Bacillus Amylobacter* abondamment développé dans la masse du tissu, soit entre les cellules, soit dans leurs cavités. Il prend assez souvent, notamment à l'intérieur des vaisseaux sculptés, la forme gélatineuse, et une légère pression expulse alors par l'orifice du vaisseau une véritable coulée d'*Amylobacter*. Quand il s'agit d'un tissu fongique, le développement d'amidon amorphe dont ce *Bacillus* est le siège a quelque chose de plus singulier encore que partout ailleurs.

2° En l'absence du *Bacillus Amylobacter*, et bien que des organismes divers (*Bacterium Termo* et *Lineola*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus*, *Monas*, etc.) s'y développent abondamment, soit entre les cellules, soit dans leurs cavités, le tissu végétal plongé macère simplement en conservant sa trame cellulaire.

Ces deux observations portent à croire que le *B. Amylobacter* est l'agent essentiel de la putréfaction végétale.

3° La preuve directe en est donnée par les expériences d'inoculation que j'ai répétées bien souvent et variées de bien des manières. Pour n'en citer qu'une, deux Radis roses entiers sont placés dans l'eau dans deux verres séparés. A l'un on inocule des *Amylobacter* jeunes; l'autre est laissé intact. Au bout de quatre jours, à la température de 25 degrés, le premier, blanchi et très-mou, sous sa cuticule encore entière, est littéralement transformé en une pulpe d'*Amylobacter*, qui s'échappe en coulées quand, par une faible pression, on vient à déchirer le sac cuticulaire. Après un mois, le second est encore rose, rigide, presque inaltéré, bien que l'on

trouve dans certaines de ses cellules des Bactéries et le *Bacillus subtilis*. La même expérience a été faite sur deux tranches minces de Radis placées en cellule dans une goutte d'eau sous une lamelle, précaution dont nous verrons tout à l'heure la nécessité ; on peut alors suivre au microscope la marche du phénomène. Dans la goutteensemencée, après quarante-huit heures, la tranche est transformée en bouillie et l'on y voit à peine quelques débris des membranes cellulaires ; dans l'autre, après huit jours, la tranche conserve sa texture, malgré le développement de Bactéries et de divers Infusoires.

Ces expériences démontrent que le *Bacillus Amylobacter* est l'agent de la putréfaction des tissus végétaux, qu'il est, à proprement parler, le ferment de la putréfaction végétale.

4° Cette putréfaction ayant pour caractère essentiel la destruction des membranes de cellulose qui constituent la trame des tissus, il est naturel de se demander s'il n'y a pas une relation entre la dissolution de la cellulose et la formation de l'amidon dans l'organisme qui est l'agent de cette destruction. Les expériences suivantes paraissent établir qu'il existe en effet une pareille relation.

On abandonne à lui-même, pur ou mélangé d'eau, du jus de Radis ou de Navet, etc., extrait par le pilon ou la presse et filtré. Il s'y développe des organismes divers, notamment le *Bacillus subtilis*, qui en altèrent diversement la composition ; mais jusqu'ici je n'y ai pas rencontré le *Bacillus Amylobacter*. Semé dans ce jus, il ne s'y développe même pas, et jusqu'à présent tous mes essais pour cultiver cet organisme dans un milieu liquide ont échoué. Je n'ai pas encore rencontré non plus le *B. Amylobacter* dans les matières animales en voie de putréfaction sous l'eau (blanc et jaune d'œuf, viande, etc.), où pullulent, comme on sait, le *Bacterium Termo* et le *Bacillus subtilis*. La présence de la cellulose (ou de l'amidon qui peut la remplacer) paraît donc indispensable au développement de ces êtres.

5° L'air nuit au développement du *B. Amylobacter*. On le montre en exposant en cellule, dans une goutte d'eau, deux tranches de tissu (de Radis, par exemple), l'une à l'air, l'autre sous une lamelle. Si l'on abandonne à elles-mêmes ces deux tranches, la première ne prend pas d'*Amylobacter* et conserve sa structure ; la seconde en acquiert généralement et se putréfie rapidement. Si l'on sème des *Amylobacter* jeunes sur les deux tranches, ils ne se développent pas dans la première, qui demeure saine ; ils pullulent bientôt dans la seconde qui se détruit promptement.

Ainsi de même que, d'après les belles recherches de M. Pasteur, le *B. subtilis* n'est ferment butyrique que s'il est privé d'oxygène libre, de même le *B. Amylobacter* n'est ferment de putréfaction végétale qu'en dehors du contact de l'air. Cette condition explique pourquoi on ne trouve pas d'*Amylobacter* à la surface des liquides de macération, tandis

qu'ils pullulent dans la profondeur, et bien plus [encore dans l'intimité des tissus d'où l'oxygène est totalement absent, même quand les fragments sont voisins de la surface du liquide.

Plusieurs autres questions encore, du plus grand intérêt pour l'histoire physiologique de cet organisme, ont été étudiées et sont aujourd'hui, en partie du moins, résolues par mes recherches. Elles seront traitées dans le travail étendu que je prépare sur ce sujet.

M. Cornu dit que dans les recherches qu'il a faites pour l'étude des Spermatisées, il a constaté l'influence néfaste des Bactéries. Dans les cultures de spermatisées où il employait comme liquides nutritifs des solutions de nitrate d'ammoniaque associé au sucre, il a vu les Bactéries se développer rapidement, notamment les formes dont Cohn a formé autrefois le genre *Zooglæa*. Aucune culture n'était alors possible. Il fait ensuite remarquer qu'on ne peut conclure à la présence de l'amidon d'après la seule coloration obtenue par l'iode. Ainsi un point situé dans l'intérieur de la thèque des *Hypoxylon*, un peu au-dessous du sommet, se colore en bleu sous l'influence de ce réactif, sans qu'il y ait cependant trace d'amidon. Il en est de même pour la paroi des théques et des paraphyses dans certaines Pezizes, ainsi que pour les apothécies des Lichens. Certains points d'une Algue, parasite sur les Conferves, l'*Aphanochaete repens*, bleuissent par l'iode, même quand on l'emploie en quantité assez faible pour colorer à peine les grains d'amidon de ces Conferves. Dans ces trois derniers cas, la coloration paraît due à une modification de la cellulose.

M. Cornu donne ensuite quelques détails sur les formations singulières qu'on rencontre sur les racines des Légumineuses et sur leur structure anatomique. Il rappelle brièvement les diverses explications données à ce sujet par Treviranus, de Candolle, Clos, etc., qu'on ne peut adopter. M. Woronine a cru y voir un effet déterminé par les Bactéries parasites. M. Cornu avait d'abord pensé pouvoir rattacher ces renflements à la présence d'un parasite d'une autre nature : à des Anguillules spéciales ; mais il a dû abandonner ensuite cette idée. Ces renflements sont dus très-probablement à la présence d'un parasite, et M. Cornu croit devoir se rattacher à l'opinion de M. Woronine, faute d'autre explication.

Revenant aux Bactéries, il dit avoir observé une espèce curieuse développée dans du carmin : l'*Ascococcus Billrothii* Cohn, remarquable par les épaisses gânes muqueuses qui entourent les groupes

d'individus qu'elle forme. Elle avait communiqué à la couleur délayée dans l'eau une viscosité telle qu'il était impossible de s'en servir pour écrire ou pour peindre.

M. Van Tieghem fait la réponse suivante :

J'ai étudié, précisément à l'occasion de mes recherches sur les *Amylobacter*, les tubercules des racines des Légumineuses, dont il vient d'être question. Les corpuscules qui en remplissent les cellules ne sont pas des Bactéries. M. Hoffmann avait d'ailleurs exprimé déjà des doutes à cet égard. Je ne puis donc pas me rattacher à l'opinion de M. Woronine qui vient d'être rappelée par M. Cornu.

M. Duchartre demande à M. Van Tieghem s'il a pu vérifier la pénétration directe des Bactéries dans les cellules des Phanérogames.

M. Van Tieghem répond qu'il ne l'a pas observée jusqu'ici et qu'il a vainement recherché des traces de pénétration dans la membrane.

M. Flahault fait la communication suivante :

❖ SUR LES RAPPORTS DE LA RADICULE AVEC LA TIGELLE DANS L'EMBRYON
DES PHANÉROGAMES, par **M. Ch. FLAHAULT.**

L'étude anatomique et histogénique de la racine a, depuis quelques années, occupé tout particulièrement les botanistes : les travaux de MM. Nägeli et Leitgeb en Allemagne, de M. Van Tieghem en France, ont jeté une vive lumière sur la question de la structure de cet organe ; mais, sur l'accroissement terminal de la racine, et sur le développement des radicelles, les résultats différents obtenus par MM. Reinke, de Janczewski, et plusieurs autres observateurs, ne permettent pas encore de poser les lois qui régissent ces phénomènes. J'ai abordé à mon tour cette étude, et j'espère, en étendant mes observations à un plus grand nombre de plantes qu'on ne l'a fait jusqu'ici, arriver à mettre d'accord les diverses opinions qui ont été émises sur ces importantes questions.

Mais si les rapports de la racine avec elle-même, et d'une radicelle avec sa racine mère, ont fait l'objet de nombreuses recherches, il est un point qu'on a négligé jusqu'ici : je veux parler des rapports de la racine avec la tige. Il était bon d'ailleurs qu'on n'abordât pas cette étude délicate avant d'avoir acquis des données à peu près certaines sur les questions précédentes ; j'ai entrepris ce travail, et ce sont les premiers résultats auxquels je suis arrivé, que j'ai l'honneur de présenter à la Société.

Les rapports d'une racine primaire avec la tige sont de deux sortes. La racine peut être *terminale* : telle est la radicule de l'embryon, dont l'axe est le prolongement de l'axe de la tigelle ; ou bien elle est *latérale*, comme sont les racines dites adventives, dont le grand axe est plus ou moins per-